

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01466

人非小细胞肺癌血管内皮细胞的分离培养及鉴定

周俊平¹, 楼国良^{1*}, 李敏玉¹, 朱海沫¹, 张辅贤²

1. 第二军医大学长海医院特需诊疗科, 上海 200433

2. 上海交通大学附属新华医院胸外科, 上海 200092

[摘要] **目的:**建立人非小细胞肺癌血管内皮细胞体外分离培养体系,研究其体外生长特性。**方法:**利用酶消化法分离出肺癌组织微血管片段,采用植块培养法培养原代内皮细胞,先后以局部消化法和差速黏附法进行纯化;应用光镜、免疫细胞化学及免疫荧光技术对所获得的人肺癌血管内皮细胞进行鉴定。**结果:**所获人非小细胞肺癌血管内皮细胞呈FⅧ-RAg、CD34阳性;电镜下生长状态良好、可传代培养。**结论:**本研究摸索并建立了人非小细胞肺癌血管内皮细胞的分离培养方法,所获人非小细胞肺癌血管内皮细胞对肿瘤血管生成及抗肿瘤药物的研究具有重要价值。

[关键词] 非小细胞肺癌;血管内皮细胞;分离培养;组织块法

[中图分类号] R 73-3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1466-04

Isolation and culture of human non-small cell lung cancer-derived vascular endothelial cells

ZHOU Jun-ping¹, LOU Guo-liang^{1*}, LI Min-yu¹, ZHU Hai-mo¹, ZHANG Fu-xian²

1. Department of Special Clinic, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Thoracic Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a method for isolating and culturing non-small cell lung cancer-derived vascular endothelial cells (NSCLCDEVCs) and to observe their characteristics *in vitro*. **Methods:** Enzyme digestion method was used to isolate microvascular fragments from human non-small cell lung cancer tissues, and explant culture method was used for primary culture of the microvascular endothelial cells, then the cells were purified by local digestion and differential adhesion method. The obtained NSCLCDEVCs were identified by optical microscope, immunocytochemistry and immunofluorescence methods. **Results:** The NSCLCDEVCs were positive for FⅧ-RAg and CD34. Microscopy showed that the cells grew well and could be passaged. **Conclusion:** We have established a method for isolating and culturing NSCLCDEVCs, and the resultant cells possess a great value for research on anti-vascularization and anti-tumor agents.

[KEY WORDS] non-small cell lung cancer; vascular endothelial cell; isolating and culturing; tissue nubbles cultivation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1466-1469]

肿瘤血管生成对实体瘤的生长及侵袭尤为重要,血管在肿瘤细胞的代谢、逃逸、进入血液循环等过程中具有重要作用,没有局部新生血管的形成,肿瘤直径可能不会超过2~3 mm^[1]。不同肿瘤源性的内皮细胞(tumor-derived endothelial cells, TEC)的形态、特征和功能存在异质性^[2],肿瘤组织新生血管内皮细胞与正常组织血管内皮细胞也存在差异。长期以来缺乏TEC分离培养体系及此类细胞系,体外研究肿瘤血管生成时一直都使用源于正常血管内皮细胞甚至内皮细胞样细胞系^[3]。因此,培养非小细

胞肺癌血管内皮细胞(non-small cell lung cancer-derived vascular endothelial cells, NSCLCDEVCs)对研究肺癌的发生、浸润、转移以及开发新药均具有重要价值^[4-5]。但目前尚缺乏供肺癌血管生成研究的理想体外内皮细胞系及其培养模型。

因此,本研究采用人非小细胞肺癌作为材料来源,探讨建立NSCLCDEVCs的分离培养方法。

1 材料和方法

1.1 标本来源 非小细胞肺癌组织取自上海新华

[收稿日期] 2008-03-02 **[接受日期]** 2008-09-10

[基金项目] 全军医学科研“十一五计划”资助项目(01MA159)。Supported by the Medical Science Research“Eleventh Five-Year-Plan”of the PLA(01MA159)。

[作者简介] 周俊平, 博士生, 主治医师。E-mail: 465263569@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-25074636, E-mail: gllou@hotmail.com

医院心胸外科手术切除新鲜标本。无菌取材后迅速将瘤组织放入 4℃ 预冷的 F12 培养液中, 低温保存带到细胞培养室。

1.2 主要试剂 F12 培养液及标准胎牛血清为 Gibco 公司产品; IV 胶原酶、胰蛋白酶为 Sigma 公司产品; FITC 标记的兔抗人 CD34、FⅧ-RAg 多克隆抗体、EnVision 免疫组化试剂盒为丹麦 Dako 公司产品; 青、链霉素购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 NSCLC DVECs 分离、纯化及培养

1.3.1 分离与培养 超净台上无菌条件下取出肺癌组织, 用 PBS 液反复冲洗, 尽可能将组织内血液冲洗掉, 去除坏死组织; 将剩下肺癌组织剪成小于 0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm 大小, 玻璃匀浆器研磨后, 无菌 200 目钢筛网过滤, 收集网上沉淀, 放入培养瓶中, 加入 0.2% 胰蛋白酶 15 ml, 常温下消化 90 min; 无菌 200 目钢筛网过滤组织悬液, 收集网上沉淀, 0.5% 胶原酶 37℃ 消化 90 min, 无菌 500 目钢筛网过滤, 最大程度保留毛细血管膜层; 挑出毛细血管薄膜样组织块, 置入适量含医用肝素 100 U/ml、10% 胎牛血清的 F12 培养液的培养皿内, 保持组织块刚好与培养皿底部接触, 放入 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养。第 3 日换液, 6~7 d 血管内皮细胞开始爬出, 3 周后弃去组织块后并继续培养, 并用倒置显微镜观察从组织块长出的人 NSCLC DVECs。

1.3.2 纯化与传代培养 在细胞传代过程中, 加入 0.2% 胶原酶消化后, 显微镜下观察到 2/3 的纤维细胞变圆, 部分脱壁, 加入 3 ml 含有血清的培养基中止消化(约 5 min), 然后用弯头吸管轻轻吹打事先在培养皿上标记的纤维样细胞生长区域, 用少量培养液漂洗 1 遍, 加入适量 10% 胎牛血清的 F12 培养液

继续培养。逐渐纯化的细胞融合后, 吸出原培养液, 加入消化液, 并用吸管反复吹打细胞层, 使其脱壁, 将悬浮的细胞接种于新的培养瓶内, 观察到 3/4 的细胞贴壁后(约 30 min), 稍加振荡, 弃去含尚未贴壁细胞的培养液。上述操作在前 4 代细胞传代时连续进行, 以完成对内皮细胞的纯化。

1.3.3 倒置相差显微镜下观察及图像分析 通过显微摄像记录组织块贴壁培养 3、6、8 d 后原代细胞及纯化的细胞传代培养的生长情况及形态变化。

1.4 内皮细胞的鉴定 1~3 代内皮细胞按照免疫荧光试剂盒说明, 以 FITC 标记的兔抗人 FⅧ-RAg 多克隆抗体、CD34 抗体进行染色鉴定, 以 PBS 作空白对照。

1.5 NSCLC DVECs 生长曲线测定 取接近长满的 NSCLC DVEC 消化制成的单细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^4 /ml, 接种至 24 孔细胞培养板中, 每孔 1.2 ml, 每 3 孔为 1 组, 共 8 组, 每隔 48 h 抽查 1 组, 用细胞计数板计算细胞数目并求均值。以培养时间为横轴, 细胞数的对数为纵轴绘制生长曲线。

2 结果

2.1 NSCLC DVECs 形态学观察及鉴定 组织块培养后 7~14 d, 部分组织块边缘可见有短梭形的以组织块为中心生长的血管内皮细胞; 初期细胞大多呈短梭形, 胞体大, 折光性强, 少数为多边形及三角形, 其间夹杂着少数胞体极细长的成纤维细胞(图 1A)。培养细胞经纯化后, 镜下观察以短梭形为主, 胞体变短并略变小, 传代接种后 5 d, 细胞开始融合, 12~15 d 形成致密融合的单层(图 1B)。Ⅷ因子相关抗原、CD34 免疫荧光呈阳性(图 1C、1D)。

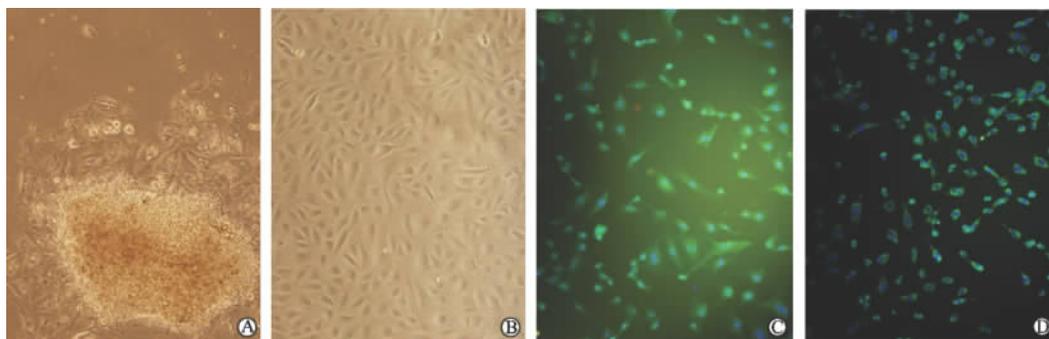


图 1 NSCLC DVECs 形态学观察及鉴定结果

Fig 1 Morphological observation and identification of NSCLC DVECs

A: Morphology of explant culture (7 d); B: Morphology of NSCLC DVECs (12-15 d); C: Expression of FⅧ-RAg in NSCLC DVECs; D: Expression of CD34 in NSCLC DVECs. Original magnification: $\times 100$

2.2 NSCLC DVECs 生长曲线 原代生长缓慢, 3~4 周生长至融合, 若从组织块周边长出细胞少, 融

合时间会更长。传代细胞生长速度明显加快, 第 3~8 日进入对数生长期, 10 d 进入平台期(图 2)。

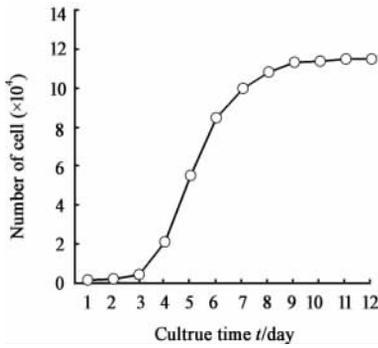


图2 NSCLC-VECs生长曲线

Fig 2 Growth curve of NSCLC-VECs

3 讨论

大量实验研究^[6-7]已证实肿瘤的形成、发展、转移等与癌症血管发生密切相关,而TEC的特性及其激活与静止是血管生成的关键。在分子水平,TEC的特性与正常内皮细胞明显不同^[8],导致TEC对抗血管生成治疗更易耐药,了解TEC的转变机制及调节因子,阻断其活性转化机制,成为抗肿瘤血管形成的重要研究课题。

目前尚未发现从人肺癌组织分离培养肺癌血管内皮细胞的方法。因此,本研究通过参考其他血管内皮细胞分离富集的方法^[9-12],进行多次摸索、探讨。结果发现:肺癌微血管内皮细胞的分离是成功的关键,一开始我们采用胰酶及胶原酶消化成单个细胞,然后参照文献^[13]进行Percoll密度梯度离心,然而发现癌组织较硬,分离出血管内皮细胞需较长时间,所得细胞无活性;中间我们曾在胰酶及胶原酶消化后再贴壁并采用医用纱布过滤,发现所得血管内皮细胞数量很少;最后我们采用组织块贴壁法,血管内皮细胞的数量得到明显提高,培养液加至保证组织块刚好与培养皿接触时内皮细胞生长速度最佳。

本实验的难点是血管内皮细胞的纯化。内皮细胞纯化目前有机刮除法、梯度离心法、克隆培养法、FACS分类法、免疫反应杀伤法、免疫磁珠法等^[14-15]。通过反复实验,我们发现梯度离心法与克隆培养法不适合本实验血管内皮细胞的纯化,而后3种方法费用昂贵。本研究采用局部消化法和差速黏附法进行纯化,利用内皮细胞比其他细胞脱壁、贴壁更快的特点,组织块贴壁置于肝素化的培养基中进行多次差别传代处理。相对来说,此种方法较繁杂及增加污染的机会,但只要我们注意无菌操作,即能够达到实验目的,并进行传代培养。培养内皮细胞主要鉴定指标是单层“卵石”样镶嵌排列的形态学特点及人第Ⅷ因子相关抗原的表达。本研究还采

用近年国际上广泛采用CD34鉴定血管内皮细胞来鉴定。

综上所述,本实验采用新鲜人非小细胞肺癌组织消化获得肿瘤微血管片段,采用植块培养法培养原代内皮细胞,依次以局部消化法和差速黏附法进行纯化;应用光镜、免疫细胞化学、免疫荧光等技术对所获得的人NSCLC-VECs进行鉴定,分离获得了较高纯度可传代并生长良好的NSCLC-VECs,为研究人非小细胞肺癌抗血管生成提供了良好的实验材料,对研究肺癌的发生、浸润、转移以及开发新药均具有重要价值。

(志谢 本研究得到第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室王梁华副教授、孙铭娟博士以及免疫学教研室孙卫民教授的大力支持和帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nat Med, 1995, 1: 27-31.
- [2] Bian X W, Chen J H, Jiang X F, Bai J S, Wang Q L, Zhang X. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4: 1537-1547.
- [3] Ha K T, Lee Y C, Kim C H. Overexpression of GD3 synthase induces apoptosis of vascular endothelial ECV304 cells through down-regulation of Bcl-2[J]. FEBS Lett, 2004, 568(1-3): 183-187.
- [4] Park H J, Kim B G, Lee S J, Heo S H, Kim J Y, Kwon T H, et al. Proteomic profiling of endothelial cells in human lung cancer [J]. J Proteome Res, 2008, 7: 1138-1150.
- [5] Tian T, Hao J, Xu A, Hao J, Luo C, Liu C, et al. Determination of metastasis-associated proteins in non-small cell lung cancer by comparative proteomic analysis [J]. Cancer Sci, 2007, 98: 1265-1274.
- [6] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86: 353-364.
- [7] Bouck N, Stellmach V, Hsu S C. How tumors become angiogenic[J]. Adv Cancer Res, 1996, 69: 135-174.
- [8] St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans K E, Montgomery E, et al. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science, 2000, 289: 1197-1202.
- [9] Yan Q, Vernon R B, Hendrickson A E, Sage E H. Primary culture and characterization of microvascular endothelial cells from Macaca monkey retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37: 2185-2194.
- [10] McGinn S, Poronnik P, Gallery E D, Pollock C A. A method for the isolation of glomerular and tubulointerstitial endothelial cells and a comparison of characteristics with the human umbilical vein endothelial cell model [J]. Nephrology (Carlton), 2004, 9: 229-237.
- [11] Gargett C E, Bucak K, Rogers P A. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells [J]. Hum Reprod, 2000, 15: 293-301.
- [12] Panzer U, Steinmetz O M, Reinking R R, Meyer T N, Fehr S, Schneider A, et al. Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial mi-

crovascular injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17: 454-464.

[13] Denning-Kendall P, Donaldson C, Nicol A, Bradley B, Hows J. Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking[J]. Exp Hematol, 1996, 24: 1394-1401.

[14] Bakken A M. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2006, 1: 47-54.

[15] Stribos M H, Gratama J W, Kraan J, Lamers C H, den Bakker M A, Sleijfer S. Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises[J]. Br J Cancer, 2008, 98: 1731-1735.

[本文编辑] 贾泽军

DOI: 10.3724/SP.J.1008.2008.01469

• 病例报告 •

POEMS 综合征伴真性红细胞增多症 1 例报告

POEMS syndrome complicated with polycythemia rubra vera: a case report

谢伟林, 刘亚芳, 管剑龙*, 韩星海, 蔡青, 戴生明, 赵东宝

第二军医大学长海医院风湿免疫科, 上海 200433

[关键词] POEMS 综合征; 真性红细胞增多症; 病例报告

[中图分类号] R 559 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2008)12-1469-01

1 临床资料 患者男, 59 岁。双足肿痛、麻木 1 年余, 伴消瘦、胸骨膨凸、多毛 5 个月。入院体检: T 37.4℃, P 90 次/min, BP 150/95 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)。头颈部、胸前皮肤呈紫红色, 四肢毛发粗且黑, 浅表淋巴结不大。胸骨隆起、表面皮肤肿胀、紫红、硬化。双侧乳房女性化, 心、肺正常。腹部膨隆, 肝肋下未及, 脾肋下 2 cm, 移动性浊音(一)。双足、双踝凹陷性水肿。双踝关节以下痛觉过敏、跟膝胫反射消失, 病理反射未引出。实验室检查: 外周血 WBC $4.99 \times 10^9/L$, Gran 57.9%, RBC $6.04 \times 10^{12}/L$, Hb 186 g/L, 红细胞压积 0.70, 网织红细胞正常, PLT $218 \times 10^9/L$ 。尿、粪常规(一)。肝功能、血脂正常, 血尿酸 $580 \mu\text{mol/L}$ 。抗核抗体阴性; CRP 3.17 mg/L, 血沉 7 mm/h。血清 IgG 21.8 g/L, IgA 3.14 g/L, IgM 2.71 g/L。血清免疫固定电泳: IgG λ 型轻链带。雌二醇 110 pmol/L, 睾酮 7.07 nmol/L; TT₃ 1.18 nmol/L, TT₄ 80 nmol/L, TSH 13.23 mIU/L; ACTH 174 ng/L, 皮质醇 187 nmol/L (上午 8:00), 171 nmol/L (下午 4:00)。骨髓细胞学: 粒、红、巨三系增生明显活跃。粒系 44.5%; 红系 39%, 以中晚期细胞为主, 成熟红细胞大小不一, 可见挤压重叠; 淋巴细胞 7%; 浆细胞 1.5%, 未见异常浆细胞; 巨核细胞呈簇分布, 全片 127 个, 散在和聚集血小板易见。血清维生素 B₁₂ > 2 000 pU/ml, 红细胞生成素 1.2 mU/ml, 中性粒细胞碱性磷酸酶积分 214 分。血气分析: 氧分压 88.3 mmHg, 动脉血氧饱和度 97.5%。心电图: 双侧腓总神经、胫神经传导速度明显减慢, 双侧正中神经、肘部未能引出动作电位, 腕部潜伏期明显延长, 上述肌肉可见失神经电位。诊断: POEMS 综合征伴真性红细胞增多症。采用甲泼尼龙 80 mg/d, 静脉滴注; 1 周后改为泼尼松 60 mg/d, 口服; 环磷酰胺 0.8 g 冲击, 每月 1 次, 左旋甲状

腺素片 50 $\mu\text{g/d}$ 口服。4 周后患者双下肢肿胀逐渐消退, 疼痛缓解。复查血常规: WBC $5.36 \times 10^9/L$, Gran 75%, RBC $5.36 \times 10^{12}/L$, Hb 154 g/L, PLT $228 \times 10^9/L$, 继续以环磷酰胺 + 泼尼松 (CP) 方案治疗, 随访 12 个月病情稳定。

2 讨论 POEMS 综合征是一种与浆细胞增生相关的多系统受损疾病, 该病最早由 Crow 和 Fukase 报道。1984 年, Nakanishi 等^[1]提出了 POEMS 综合征的临床特征, 包括多发周围神经病 (P)、多脏器肿大 (O)、内分泌改变 (E)、异常球蛋白 (M 样蛋白) 和皮肤异常 (S), 并且强调核心症状为多发周围神经病和 M 样蛋白。该例患者符合 POEMS 综合征的临床特点, 红细胞容量增多, 骨髓红系显著增生, 中性粒细胞碱性磷酸酶活性增高, 血清维生素 B₁₂ > 2 000 pU/ml 和动脉血氧饱和度 97.5%, 符合真性红细胞增多症的诊断标准。POEMS 综合征合并真性红细胞增多症者罕见, 国内仅涂三进等^[2]和周晋等^[3]分别报道 POEMS 综合征伴血小板增多症和伴骨髓增殖性疾病各 1 例, POEMS 综合征与骨髓增殖性疾病的相关性均有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Nakanishi T, Sobue I, Toyokura Y, Nishitani H, Kuroiwa Y, Satoishi E, et al. The Crow-Fukase syndrome: a study of 102 cases in Japan[J]. Neurology, 1984, 34: 712-720.
- [2] 涂三进, 任天华, 刘文励. POEMS 综合征伴血小板增多症一例[J]. 中华血液学杂志, 2001, 22: 487.
- [3] 周晋, 孟然, 李丽敏, 贾建平, 杨宝峰. POEMS 综合征伴骨髓增殖性疾病一例[J]. 中华内科杂志, 2006, 45: 328.

[本文编辑] 尹茶

[收稿日期] 2008-08-29 [接受日期] 2008-09-18

[作者简介] 谢伟林, 硕士生. E-mail: xieweilind@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25074698, E-mail: guanjianlong@medmail.com.cn